

Biológia Doktori Iskola, Immunológia Doktori Program
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Doktori Iskola és Program vezetője: Prof. Erdei Anna

***In vivo* fehérje-DNS kölcsönhatások és CpG-metilációs mintázatok
vizsgálata látens Epstein-Barr vírus genomok EBER promóter
régijában**

A Doktori értekezés tézisei

Bánáti Ferenc

Kutatómunka: Országos Epidemiológiai Központ, Mikrobiológiai Kutatócsoport

Témavezető: Dr. Minárovits János, M.D., az MTA doktora,
a kutatócsoport vezetője



2010

BEVEZETÉS

A soksejtű szervezetek különféle sejtípusokból épülnek fel, melyek pontosan ugyanazt vagy szinte ugyanazt a genetikai információt hordozzák. Ezen fenotípus sokszínűség mögött bonyolult folyamatok rejlenek, melyek a gének eltérően kontrollált szabályozásán keresztül valósulnak meg az egyes sejtekben. A szabályozási utak megnyílvánulhatnak közvetlenül az örökítőanyag nukleinsav sorrendjétől függő folyamatokban, illetve a genomi DNS poszt-szintetikus módosításain alapuló ún. epigenetikai folyamatokban.

Az Epstein-Barr vírus (EBV) egy humánpatogén herpeszvírus, a mononukleózis infekciója okozója, és számos tumoros megbetegedéssel, többek között a Burkitt limfómával (BL) is szoros összefüggésbe hozható. A humán B sejtek és a garat hámsejtjeinek megfertőzését követően a vírus általában látens formában, vírus termelés nélkül perzisztál B sejtekben. Egészséges személyekben az EBV lítikus replikációja ritkán, a vírus esetleges aktivációjakor következik be. Látensen fertőzött sejtekben korlátozott virális génexpresszió figyelhető meg, melyet az alternatív promóter használat alapján különböző látencia típusokba sorolhatunk (I, II, III). A különböző látencia típusokban az EBV hozzávetőleg 100 génjéből maximálisan 10 gén aktív. Az erősen limitált számú látens génterméknek köszönhetően az EBV képes rejtve maradni a gazdaszervezet immunrendszere előtt.

A látensen átíródó gének közül az EBER transzkriptumok (EBER1 és 2) a legnagyobb mennyiségben jelenlevő termékek. Ezen fehérjét nem kódoló RNS-ek promóterén RNS polimeráz II-re (Pol II) és RNS polimeráz III-ra (Pol III) jellemző elemek egyaránt megtalálhatók. Látencia típustól független, állandó aktivitásuk a vírus életciklusában betöltött elengedhetetlen szerepükre utal. Annak ellenére, hogy a tumorképző folyamatokban való részvételüket már igazolták, a pontos hatásmechanizmusukat még nem sikerült tisztázni.

Ma már nyilvánvaló, hogy a citozin-guanin dinukleotidok (CpG) metilációja, és a promóter különféle hiszton modifikációi kulcsfontosságú szerepet töltenek be a Pol II által átírt celluláris és virális gének szabályozásában. A Pol III által átírt gének esetében azonban a CpG-metiláció szerepe kevésbé egyértelmű, mivel CpG-metilációra érzékeny és inszenzitív Pol III promóterek egyaránt léteznek.

Az EBER1 és 2 gének állandó aktivitása és tumorigenezisben igazolt részvétele alapján, fontos a szabályozó szekvenciájukon található fehérjekötési mintázatok, a CpG-metilációs mintázatuk és a kromatin szerkezetük vizsgálata, hogy minél többet megtudjunk az aktivitásuk szabályozásában résztvevő folyamatokról.

CÉLKITŰZÉSEK

- 1) Az **EBER régió részletes CpG-metilációs térképének elkészítéséhez** az EBER gének szabályozó és kódoló szekvenciáját kívántam vizsgálni különböző sejtvonalakon biszulfid szekvenálás módszerével.
- 2) Az **EBER1 és EBER2 gének aktivitásának meghatározását** real-time PCR alkalmazásával kívántam elvégezni különböző sejtvonalakban.
- 3) Célul tűztem ki a **CpG-metiláció hatásának vizsgálatát az EBER promóterek aktivitására** *in vitro* CpG-metilált, illetve metilálatlan EBER tartalmú vektor EBV-negatív sejtvonalakba történő transzfekciójával.
- 4) A korábban, B sejtvonalakon publikált DMS *in vivo* footprinting eredmények kiegészítéseképpen terveztem megvizsgálni a C666-1 nazofaringeális karcinóma sejtvonal **EBER1 szabályozó régióján található fehérjekötési mintázatot**.
- 5) Az EBER1 szabályozó régiójának egy fragmentjét használva, *in vitro* footprinting-gel kívántam **feltárni a különbségeket metilálatlan és *in vitro* metilált EBER1 promóter fehérjekötési mintázatában**.
- 6) Annak vizsgálatára, hogy **a különféle magi fehérjék (ATF, CTCF) kötődése függ-e a felismerő szekvencia metilációs állapotától**, az EMSA ("electromobility shift assay") módszert kívántam alkalmazni metilált és metilálatlan kötőhelyekkel rendelkező DNS fragmentumok felhasználásával.
- 7) A kromatin immunprecipitáció alkalmas feltételezett vagy *in vitro* körülmények között megfigyelt fehérje-DNS kapcsolatok *in vivo* igazolására. Ezen a módon terveztem megvizsgálni **az EBER1 promóter esetében leírt transzkripció faktorok esetleges *in vivo* kötődését**.
- 8) A különféle hiszton módosításoknak a promóteraktivitás szabályozásában betöltött fontos szerepe miatt, **célul tűztem ki aktiváló hiszton módosulások mennyiségi meghatározását az EBER lókuszt szabályozó és kódoló régióiban**.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtvonalak

A kísérleteimben használt sejtvonalak között voltak I. látencia típusú és III. látencia típusú Burkitt limfóma, III. látencia típusú limfoblasztoid sejtvonalak, továbbá egy I.

látenciájú EBV-t hordozó nazofaringeális karcinóma sejtvonal. Mindemellett B sejt és epiteliális eredetű EBV-negatív sejtvonalakat is vizsgáltam.

DNS és RNS tisztítás

A teljes genomi DNS tisztítása sejtkultúrából történt hagyományos eljárás szerint. A sejtkultúrákból az RNS mintákat Tri-reagens felhasználásával nyertem a gyártó által javasolt lépéseket követve. A DNS és RNS mintákat ultratiszta dH₂O-ban oldottam fel.

***In vitro* metiláció és transzfekció**

Egy, az EBER régiót hordozó pBS- plazmidot M⁵ssI CpG-metiltranszferáz enzimmel metiláltam, majd a tisztított konstruktot és a metilálatlan kontroll plazmidot DEAD-dextrán, vagy Eugene transzfekciós reagens alkalmazásával B, illetve epiteliális eredetű sejtvonalakba transzfektáltam. 48 órával a transzfekciót követően teljes DNS és RNS izolálására került sor. A DNS mintákat CpG-metilációs vizsgálathoz, az RNS-eket pedig a kontroll gének (GFP és β -aktin) és az EBER1 és EBER2 gének aktivitásának megállapítására használtam.

Biszulfid szekvenálás

Az egyszálú DNS-ben található metil-citozinok (5^mC) ellenállnak a biszulfid kezelésnek, és a PCR reakció során citozinként szaporodnak fel, míg a metilálatlan citozinok uracillá alakulnak és timinként amplifikálódnak. Ebből adódóan a szekvenálási eredmények összehasonlításával megállapítható, hogy mely citozinok voltak metiláltak, illetve metilálatlanok. A biszulfid kezelés Frommer és *mtsai*. (1992) és Clark és *mtsai*. (1994) által leírt módon zajlott. A modifikált DNS minták szekvenálását Myöhänen és *mtsai*. (1994) által leírtak szerint végeztem.

Reverz transzkripció

A cDNS-t a Superscript III reverz transzkriptáz enzim segítségével készítettem 1 μ g DNázal kezelte RNS-ből, génspecifikus primerek alkalmazásával a gyártó által javasolt módon.

Real-time PCR

A real-time PCR alkalmas DNS és cDNS minták mennyiségi vizsgálataira. A módszert DNS mennyiségek, génaktivitás, illetve különböző fehérjék (CTCF, acetilált és metilált hisztonok) EBER régióhoz való *in vivo* kötődésének meghatározására használtam.

Az amplifikációs reakcióhoz a LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kitet használtam. A minták kiindulási nukleinsav koncentrációja egy 10x-es hígítási sorra illesztett standard görbe alapján történt. A relatív koncentrációk megállapítására a LightCycler Software 4.05 program felhasználásával került sor.

DMS *in vivo* footprinting

A genomi footprinting eljárást a Niller és *mtsai*. (1995) által korábban leírt módon végeztem. A reakcióhoz C666-1 sejt kultúrát használtam fel, melyet dimetil-szulfáttal (DMS) kezeltem. A reakció leállítását követően a sejtekből genomi DNS-t izoláltam. A kapott DNS mintákat piperidinnel kezeltem, így a szálak a DMS-módosított guaninoknál fragmentálódtak. A fehérjelátnyomok láthatóvá tételére ligáció-mediálta PCR-t alkalmaztam (LM-PCR) 2 µg szekvenált (DMS-kezelt “naked DNS”), illetve “footprint”-elt (*in vivo* DMS-kezelt) DNS mintákon a korábban leírt eljárást követve, kisebb módosításokkal.

***In vitro* footprinting**

Annak megállapítására, hogy mely transzkripciós faktorok érzékenyek a felismerő szekvenciájuk metilációs állapotára, *in vitro* footprinting kísérleteket végeztem *in vitro* metilált és metilálatlan EBER1 promóter szekvenciákon. A fehérjekötési mintázatok összehasonlításával következtetni lehet arra, hogy a CpG-metiláció következtében mely kötődések gátlódnak. A módszer a Core Footprinting System és a Niller és *mtsai*. (1991) által leírtak alapján került alkalmazásra.

EMSA

Az elektroforetikus mobilitási vizsgálat és “antibody supershift” kísérletek alkalmasak egy feltételezett fehérje-DNS kötés kísérletes megerősítésére, másrészt annak feltérképezésére, hogy egy vizsgálni kívánt fehérje képes-e kötődni egy adott DNS szekvenciához. Ebben a módszerben egy rövid duplaszálú DNS-t inkubálunk magi fehérjék jelenlétében, illetve a kérdéses DNS-kötő fehérjére specifikus ellenanyag jelenlétében, vagy hiányában. A komplexeket akrilamid gélben választjuk szét. Amennyiben az ellenanyag mobilitásbeli eltérést okoz az ellenanyag nélküli mintával összehasonlítva, megállapíthatjuk hogy az adott fehérje valóban képes-e a vizsgált szekvenciához kötődni *in vitro*. Kísérleteim során az ATF és CTCF fehérjék kötődését vizsgáltam az EBER1 promóter 5' régióján.

Az eljárás a Niller és Hennighausen, (1990), illetve a Hennighausen és Lubon (Methods in Enzymology) által közölt leírás alapján történt.

Kromatin immunprecipitáció

A kromatin immunprecipitációt (ChIP) *in vivo* fehérje-DNS interakciók vizsgálatára használják. Az eljárás során a DNS-hez kötődő fehérjéket kémiai reakcióval kovalensen keresztkötjük, majd a tisztított kromatint kisebb hosszúságú darabokra (300-1500 bp) törjük. A vizsgált fehérjét és a hozzákötött DNS fragmentumot a fehérjére specifikus ellenanyaggal és annak Fc részét kötő Protein A gyöngyökkel kiprecipitáljuk. Ezt követően alkalmunk van a kinyert DNS darabkák azonosítására, illetve azok mennyiségi meghatározására, ami a vizsgált protein *in vivo* affinitását mutatja az adott szekvencia iránt. Kísérleteimben a c-Myc, a CTCF fehérje és a különféle hiszton módosulások *in vivo* gyakoriságát vizsgáltam az EBER lókuszon.

A ChIP eljárás Farnham és mtsai. (2002) által leírtaknak megfelelően történt, kisebb módosításokkal.

EREDMÉNYEK

1. A különböző sejtvonalakban és sejttypusokban **széleskörű hipometiláció** volt megfigyelhető **az EBER lókuszteljes területén**.
2. Az EBER1 és EBER2 gének egyaránt **jelentős aktivitást** mutattak, és nagy mennyiségben fejeződtek ki a vizsgált sejtvonalakban.
3. Annak vizsgálata során, hogy a szekvencia *in vitro* metilációja miképpen hat az EBER gének aktivitására, azt tapasztaltam, hogy a régió **CpG-metilációjának következtében jelentős módon lecsökkent az EBER-ek átíródása** a transzfektált sejtekben.
4. Az *in vivo* genomi footprinting kísérletek azt mutatták, hogy a C666-1 **nazofaringeális karcinóma sejtvonal EBER1 régiójában a fehérjekötési mintázat nagymértékben hasonló a korábban B sejtvonalak esetében leírtakhoz**.
5. A metilált és metilálatlan EBER1 promóteren alkalmazott *in vitro* footprinting kísérletek azt mutatták, hogy **metiláció hatására számos fontos szabályozó szekvencián** (c-Myc, Sp1, ATF köthelyek, Box-A, -B) **megváltoztak a fehérje-DNS kölcsönhatások**. A TATA köthelyen **mind metilált, mind metilálatlan DNS esetében jól látható fehérjelábnymot** tapasztaltam.
6. Az EBER1 **metilálatlan ATF köthelye specifikus komplexet** alkotott magi fehérjék jelenlétében az elektroforetikus mobilitási vizsgálat szerint. Ez a komplex az *in vitro*

metilált ATF kötőhely esetén **nem** volt tapasztalható. ATF-2 ellen irányuló ellenanyaggal végzett “antibody supershift” kísérlettel az ATF-2 protein kötődését nem sikerült igazolni.

Hasonló kísérletekben **specifikus komplex kialakulását nem tudtam kimutatni az EBER1 promóter feltételezett CTCF kötőhelyének** esetén, sem I. sem III. látencia-típusú BL-ekből származó magi fehérjék jelenlétében.

7. **Sikerült bizonyítani a c-Myc transzkripciós faktor és onkoprotein *in vivo* kötődését az EBER promóter 5' régiójához** kromatin immunprecipitációval.

A korábban Day és mtsai. (2007) által leírt **feltételezett CTCF kötőhely** az EBER1 gén 5' szabályozó régióján **meglehetősen gyengének tűnt**, mivel csupán a szekvencia alig észlelhető dúsulását tapasztaltam ChIP kísérletekben.

8. Az aktiváló hiszton módosításokkal végzett ChIP kísérletek során az tapasztaltam, hogy a **teljes EBER régió** meglehetősen **gazdag acetilált H3-ban, acetilált H4-ben és dimetilált H3K4 módosításban**, bár **kisebb különbségek** megfigyelhetők voltak a **sejtvonalak között**. Váratlan eredmény volt a **C666-1 sejtvonal** EBER1 génjének 5' régióján megfigyelt teljes **H3K4me2 hiány**.

KÖVETKEZTETÉSEK

A minden esetben magas aktivitást mutató EBER gének metilációs finomtérfékezése megmutatta, hogy az egész régió szinte teljesen metilálatlan minden vizsgált sejtvonalban. Ez arra enged következtetni, hogy a gének aktivitása metiláció-szenzitív, melyet transzfekciós kísérletekkel sikerült alátámasztani, vagyis az EBER-ek aktivitása a régió metilációjának hatására gátlódik. *In vitro* módszerekkel sikerült fényt deríteni arra is, hogy a metiláció az aktiváló transzkripciós faktorok bekötődésének gátlásával fejt ki hatását, és inaktíválja az EBER gének átírását.

Az EBER1 gén *in vivo* fehérje-DNS kölcsönhatásainak feltérképezése B sejt eredetű sejtvonalakon korábban megtörtént, melyet kiegészítettem a nazofaringeális karcinóma sejtvonal C666-1 DMS footprinting vizsgálatával. Az adatok összevetésével megállapítottam, hogy a fehérjelábnym mintázat a vizsgált B és hám eredetű sejtvonalakban azonos, vagyis a promóterhez kötődő fehérjék nem sejttípus-specifikusan foglalják el a felismerő szekvenciájukat.

Úgy vélem, hogy a c-Myc fehérje *in vivo* kötődésének kimutatása az EBER1 5' szekvenciájához nagyon fontos eredménynek tekinthető. Ez a kötődés magyarázattal szolgálhat többek között a Burkitt limfómák kialakulására, ugyanis a BL-ekre jellemző transzlokáció következtében megemelkedett c-Myc fehérje mennyiség transzaktiválni képes az antiapoptotikus hatású EBER géneket. Így a csíráközpontokban képződő c-myc transzlokációt hordozó B sejt klónok túlélési esélyei megnőnek, ami alapul szolgálhat Burkitt limfóma kialakulásához. A c-Myc fehérje kromatin átszerveződésben (remodelling) igazolt szerepe fontos lehet továbbá a régió nyitott kromatin szerkezetének kialakításához és fenntartásához. Ezek mellett a c-Myc fehérje képes a vele kapcsolatba került DNS szakaszt a nukleáris mátrixhoz kapcsolni, így részt vehet a látens EBV episzómák megtartásában a sejtosztódások során.

A nyitott kromatin szerkezet meglétét sikerült alátámasztani azzal is, hogy a teljes EBER lókuszon aktív kromatinra utaló, aktiváló hiszton modifikációk feldúsulását tapasztaltuk.

A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Niller, H.H., Salamon D., Ilg, K., Koroknai, A., **Banati, F.**, Bäuml, G., Rucker O. L., Schwarzmann, F., Wolf, H., Minarovits, J. (2003). The *in vivo* binding site for oncoprotein c-Myc in the promoter for Epstein-Barr virus (EBV) encoded RNA (EBER) 1 suggest a specific role for EBV in lymphomagenesis. Med. Sci. Monit. 9(1):HY1-9.

Banati F, Koroknai A, Salamon D, Takacs M, Minarovits-Kormuta S, Wolf H, Niller HH, Minarovits J (2008). CpG-methylation silences the activity of the RNA polymerase III transcribed EBER-1 promoter of Epstein-Barr virus. FEBS Lett. 582(5):705-9.

Salamon D, **Banati F**, Koroknai A, Ravasz M, Szenthe K, Bathori Z, Bakos A, Niller HH, Wolf H, Minarovits J (2009). Binding of CCCTC-binding factor *in vivo* to the region located between Rep* and the C promoter of Epstein-Barr virus is unaffected by CpG methylation and does not correlate with Cp activity. J Gen Virol. 90(Pt 5):1183-9.

A TÉMÁBAN MEGJELENT TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK

Helmut Niller H, Salamon D, Ilg K, Koroknai A, **Banati F**, Schwarzmann F, Wolf H, Minarovits J (2004). EBV-associated neoplasms: alternative pathogenetic pathways. Med Hypotheses. 62(3):387-91.

Niller HH, Salamon D, **Banati F**, Schwarzmann F, Wolf H, Minarovits J (2004). The LCR of EBV makes Burkitt's lymphoma endemic. Trends Microbiol. 12(11):495-9.

Niller HH, Salamon D, Rahmann S, Ilg K, Koroknai A, **Banati F**, Schwarzmann F, Wolf H, Minarovits J (2004). A 30 kb region of the Epstein-Barr virus genome is colinear with the rearranged human immunoglobulin gene loci: implications for a "ping-pong evolution" model for persisting viruses and their hosts. A review. Acta Microbiol Immunol Hung. 51(4):469-84.

Maria Takacs, Judit Segesdi, **Ferenc Banati**, Anita Koroknai, Hans Wolf, Hans Helmut Niller, Janos Minarovits (2009). The importance of epigenetic alterations in the development of Epstein-Barr virus-related lymphomas. Medit J Hemat Infect Dis, 1, Open Journal System.

Takacs M, **Banati F**, Koroknai A, Segesdi J, Salamon D, Wolf H, Niller HH, Minarovits J. (2010). Epigenetic regulation of latent Epstein-Barr virus promoters. Biochim Biophys Acta. 1799(3-4):228-235.

A TÉMÁBAN TARTOTT ELŐADÁSOK

Niller, H.H., Salamon D., **Bánáti F**, Koroknai A., Ilg, K., Rahmann, S., Schwarzmann, F., Wolf, H. and Minárovits, J. Direct binding of the oncoprotein c-myc to the Epstein-Barr virus genome suggests a novel molecular model for the origin of Burkitt's lymphoma. 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, 2003.

Bánáti, F., Niller, H.H., Koroknai, A., Takács, M., Wolf, H., and Minárovits, J., and Salamon, D. *In vivo* c-myc binding and hypomethylation at the regulatory region of the constitutively transcribed EBER genes. 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, 2003.

Bánáti Ferenc, Hans Helmut Niller, Hans Wolf, Koroknai Anita, Minárovits János, Takács Mária, Salamon Dániel. *In vitro* metiláció hatása az EBV EBER génjeinek expressziójára. (The effect of *in vitro* methylation on the expression of the EBER genes of EBV). Forum of the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely, 2004.

Hans H Niller, Dániel Salamon, Anita Koroknai, **Ferenc Bánáti**, György Fejér, Ildikó Győri, Fritz Schwarzmann, Hans Wolf, János Minárovits. The locus control region of Epstein-Barr virus. 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely, 2005.

Ferenc Bánáti, Anita Koroknai, Mária Takács, Dániel Salamon, Hans Helmut Niller, János Minárovits. Epigenotypes of EBER1 and 2 genes of Epstein-Barr virus in lymphoid and nasopharyngeal carcinoma cell lines. 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely, 2005.

Ferenc Bánáti, Anita Koroknai, Mária Takács, Dániel Salamon, Hans Helmut Niller, János Minárovits. Effect of CpG methylation on binding of nuclear proteins to the EBER 1 promoter of Epstein-Barr virus. 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, 2007.